

PCT
NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

**Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE**
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 15 May 2001 (15.05.01)	ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No. PCT/EP00/08693	Applicant's or agent's file reference 51754AWOM1XX
International filing date (day/month/year) 06 September 2000 (06.09.00)	Priority date (day/month/year) 08 September 1999 (08.09.99)
Applicant DEBUS, Nils-Peter et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 February 2001 (17.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

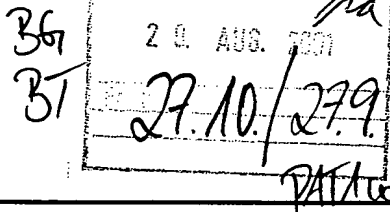
<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Pascal Piriou</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
---	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ANMELDUNG AUF DEM GEBIET DES PATENTS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

An

MAGER, Knut
Müllerstrasse 178
13342 Berlin
GERMANY



MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

Signature
cl. L. 10. 10. 01

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

27/08/2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

51754AWOM1XX21+P

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08693

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

06/09/2000

Anmelder

INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER...

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsbüro dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. Weiteres Vorgehen: Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von 18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis 90 bis 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von 20 Monaten seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsbüro vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Joannes Vergoosen

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19(1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

Applicant's or agent's file reference 51754AWOM1XX		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08693	International filing date (day/month/year) 06 September 2000 (06.09.00)	Priority date (day/month/year) 08 September 1999 (08.09.99)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 49/00,			
Applicant INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN			

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 17 February 2001 (17.02.01)	Date of completion of this report 11 December 2001 (11.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08693

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-25, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-23, filed with the letter of 06 November 2001 (06.11.2001),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-17, 21, 22	YES
	Claims	18, 19, 20, 23	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-17, 22	YES
	Claims	18-21, 23	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1 = WO-A-98/18498;

D2 = WO-A-98/18501;

D3 = KIKUTA, AKIO ET AL.: "Localization of ligands for L-selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates", BLOOD (1994), 84(11), 3766-75, XP001015464.

Claims 1-17, 22

D1 and D2 disclose contrast agents (in particular ultrasound contrast agents), wherein a receptor with gas-filled particles is connected as a signal unit. The receptors used are directed at endothelial ligands. Different reagents are used to bond the signal units to the receptors. However, the description and the examples do not suggest that a bond takes place on the C-terminal end of the receptor.

D3 discloses selectin IgG-chimera connected with colloidal gold for representing lymph tissue.

However, the description does not suggest that the

gold is complexed at the C-terminal end of the receptor.

Hence, the subject matter of Claims 1-17 and 22 is novel under PCT Article 33(2).

The problem addressed by the present invention can thus be seen as that of making available contrast agents for representing lymph node changes, which bond specifically to endothelial ligands (with the N-terminal protein end). The applicant has shown that this is possible using receptors, the C-terminal ends of which have signal units. None of the documents cited discloses or suggests this solution.

Hence, the subject matter of Claims 1-17 and 22 involves an inventive step according to PCT Article 33(3).

Claims 18-19, 20 and 23

The features (bonding of the signal unit to the C-terminal end) that differentiate Claim 1 from the prior art are not contained in independent Claims 18-19, 20 and 23.

Hence, D3 anticipates the novelty of Claims 18,19, 20 and 23 (PCT Article 33(2)).

Claim 21

The use of a polyhistidine group as a coupling group is not described in any of the documents cited.

Hence, the subject matter of Claim 11 is novel (PCT Article 33(2)).

Claim 21, however, does not contain any feature that

comprises a coupling of the signal unit at the C-terminal end of the receptor.

Hence, Claim 21 does not involve an inventive step that extends over the entire breadth of the claim (PCT Article 33(3)).

Industrial applicability

Claims 1-23 satisfy the criteria of industrial applicability (PCT Article 33(4)).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The back references of Claims 16, 17, 19 and 21 are not clear (PCT Article 6).

Claims 20-22 contain all the features of Claim 18 and hence are not correctly worded as dependent on the latter claim (PCT Rule 6.4).

VERTRAG FÜR DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 51754AWOM1XX	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 08693	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 06/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/09/1999
Anmelder INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER...		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 A61K49/00 A61K49/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 18498 A (MARSDEN JOHN CHRISTOPHER ;GODAL ASLAK (NO); HOEGSET ANDERS (NO); K) 7. Mai 1998 (1998-05-07) Ansprüche 1,11-13,19 ---	1-7,11, 17,21,24
X	WO 98 18501 A (MARSDEN JOHN CHRISTOPHER ;HELLEBUST HALLDIS (NO); HOFF LARS (NO);) 7. Mai 1998 (1998-05-07) Seite 47, Zeile 10 -Seite 49, Zeile 20; Ansprüche 1,11,12 Seite 50, Zeile 5 --- -/-	1-7,11, 17,21,24



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. August 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/08/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KIKUTA, AKIO ET AL: "Localization of ligands for L- selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates" BLOOD (1994), 84(11), 3766-75 , XP001015464 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 Seite 3769, Spalte 1 Seite 3773, Spalte 1, Absatz 2 ---	1-7,13, 17,21,24
Y	WATSON, SUSAN R. ET AL: "A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules" J. CELL BIOL. (1990), 110(6), 2221-9 , XP001015456 Zusammenfassung ---	1-24
Y	WO 94 00477 A (GLYCOMED INC) 6. Januar 1994 (1994-01-06) Beispiel 14 ---	1-24
Y	WO 99 32154 A (SCHERING AG) 1. Juli 1999 (1999-07-01) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08693

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9818498 A	07-05-1998	AU 4786897 A	22-05-1998
		AU 4786997 A	22-05-1998
		AU 4787097 A	22-05-1998
		EP 0971747 A	19-01-2000
		EP 0946202 A	06-10-1999
		EP 0963209 A	15-12-1999
		WO 9818496 A	07-05-1998
		WO 9818497 A	07-05-1998
		JP 2001502719 T	27-02-2001
		US 6264914 B	24-07-2001
		US 6051207 A	18-04-2000
		AU 733495 B	17-05-2001
		AU 4786697 A	22-05-1998
		AU 4786797 A	22-05-1998
		BG 103438 A	31-01-2000
		BR 9712683 A	19-10-1999
		CN 1234742 A	10-11-1999
		CZ 9901494 A	15-09-1999
		EP 0973552 A	26-01-2000
		EP 0991427 A	12-04-2000
		WO 9818501 A	07-05-1998
		WO 9818495 A	07-05-1998
		JP 2001503407 T	13-03-2001
		NO 991889 A	28-06-1999
		US 6264917 B	24-07-2001
		US 6261537 B	17-07-2001
		AU 733477 B	17-05-2001
		AU 4718297 A	22-05-1998
		BG 103439 A	31-01-2000
		BR 9713978 A	02-05-2000
		CN 1238700 A	15-12-1999
		EP 1007101 A	14-06-2000
		WO 9818500 A	07-05-1998
		HU 0000357 A	28-06-2000
		NO 991890 A	28-06-1999
		AU 7068798 A	13-11-1998
		EP 0977600 A	09-02-2000
		WO 9847541 A	29-10-1998
		HU 9904595 A	28-04-2000
		US 6209367 B	03-04-2001
WO 9818501 A	07-05-1998	AU 733495 B	17-05-2001
		AU 4786697 A	22-05-1998
		AU 4786897 A	22-05-1998
		AU 4786997 A	22-05-1998
		BG 103438 A	31-01-2000
		BR 9712683 A	19-10-1999
		CN 1234742 A	10-11-1999
		CZ 9901494 A	15-09-1999
		EP 0973552 A	26-01-2000
		EP 0971747 A	19-01-2000
		EP 0946202 A	06-10-1999
		WO 9818496 A	07-05-1998
		WO 9818497 A	07-05-1998
		JP 2001503407 T	13-03-2001
		NO 991889 A	28-06-1999
		US 6264914 B	24-07-2001
		US 6051207 A	18-04-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08693

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9818501 A		US 6264917 B	24-07-2001
		US 6261537 B	17-07-2001
		AU 4786797 A	22-05-1998
		AU 4787097 A	22-05-1998
		EP 0991427 A	12-04-2000
		EP 0963209 A	15-12-1999
		WO 9818495 A	07-05-1998
		WO 9818498 A	07-05-1998
		JP 2001502719 T	27-02-2001
		AU 733477 B	17-05-2001
		AU 4718297 A	22-05-1998
		BG 103439 A	31-01-2000
		BR 9713978 A	02-05-2000
		CN 1238700 A	15-12-1999
		EP 1007101 A	14-06-2000
		WO 9818500 A	07-05-1998
		HU 0000357 A	28-06-2000
		NO 991890 A	28-06-1999
		AU 7068798 A	13-11-1998
		EP 0977600 A	09-02-2000
		WO 9847541 A	29-10-1998
		HU 9904595 A	28-04-2000
WO 9400477 A	06-01-1994	AU 678373 B	29-05-1997
		AU 4652693 A	24-01-1994
		CA 2138645 A	06-01-1994
		EP 0648223 A	19-04-1995
		JP 8500820 T	30-01-1996
		US 5591835 A	07-01-1997
		US 5728685 A	17-03-1998
WO 9932154 A	01-07-1999	DE 19758105 A	24-06-1999
		AU 2268099 A	12-07-1999
		EP 1037672 A	27-09-2000

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED ACCORDING TO THE PATENT
COOPERATION TREATY (PCT)

(19) WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Office

(43) International publication date
March 15, 2001 (3/15/2001) PCT

(10) International publication number
WO 01/17566 A2

(51) International patent classification⁷: A61K 49/00

(21) International file number: PCT/EP00/08693

(22) International application date: September 6, 2000
(9/6/2000)

(25) Filing language: German

(26) Publication language: German

(30) Priority data: 199 43 710.6 September 8, 1999 (9/8/1999) DE
100 13 849.7 March 15, 2000 (3/15/2000) DE

(71) Applicant (for all designated countries except the U.S.):
**INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN
UNIVERSITÄT BERLIN [INSTITUTE FOR DIAGNOSTIC RESEARCH GMBH
OF THE FREE UNIVERSITY OF BERLIN] [DE/DE]; Spandauer Damm
130, 14050 Berlin (DE).**

(72) Inventors; and

(75) Inventors/applicants (only for the U.S.):
**DEBUS, Nils-Peter [DE/DE]; Friedrich-Karl-Str. 27, 13403
Berlin (DE). SYDOW, Sabine [DE/DE]; Kreuznacher Strasse 9,
14197 Berlin (DE). HOFMANN, Birte [DE/DE]; Fasanenstrasse
29, 10719 Berlin (DE). BRIEL, Andreas [DE/DE];**

Gärtnerstrasse 25, 10245 Berlin (DE). **RÖSSLING, Georg**

[DE/DE]; Niederbarnimstrasse 24, 16548 Glienicke (DE).

(74) Attorney: **MAGER, Knut**; Müllerstrasse 178, 13342 Berlin (DE).

(81) Designated countries (National): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated countries (Regional): ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

-- Without international search report and to be republished after receipt of the report.

To clarify the two-letter code, and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

(54) **Title:** L-SELECTIN CONTRAST MEDIA

(57) **Abstract:** The invention relates to new contrast media for visualization of lymph node changes and inflammatory processes as well as pathological changes that are associated with the specific expression of endothelial and/or leukocytic ligands, as well as process for their production.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 13 DEC 2001

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 51754AWOM1XX21+P	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08693	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 06/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 08/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K49/00		
Anmelder INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH ... et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 17/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Büttner, U Tel. Nr. +49 89 2399 7841 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-23 eingegangen am 06/11/2001 mit Schreiben vom 06/11/2001

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-17, 21, 22
	Nein: Ansprüche	18, 19, 20, 23
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-17, 22
	Nein: Ansprüche	18-21, 23
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	

- 2. Unterlagen und Erklärungen**
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 98 18498 A

D2: WO 98 18501 A

D3: KIKUTA, AKIO ET AL: 'Localization of ligands for L- selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates' BLOOD (1994), 84(11), 3766-75 , XP001015464

Ansprüche 1-17, 22

D1 und D2 offenbaren Kontrastmittel (im besonderen Ultraschallkontrastmittel), wobei ein Rezeptor mit gasgefüllten Teilchen als Signaleinheit verbunden ist. Die verwendeten Rezeptoren sind dabei gegen endotheliale Liganden gerichtet. Die Signaleinheiten werden dabei mit Hilfe verschiedener Reagenzien an die Rezeptoren gebunden. Aus der Beschreibung und aus den Beispielen geht jedoch nicht hervor, daß eine Bindung am C-terminalen Ende des Rezeptors stattfindet. D3 offenbart mit kolloidalem Gold verbundene Selectin-IgG-Chimäre zur Darstellung von Lymphgewebe. Aus der Beschreibung geht jedoch nicht hervor, daß das Gold am C-terminalen Ende des Rezeptors komplexiert wird. Daher wird der Gegenstand der Ansprüche 1-17, 22 als neu gemäß Artikel 33(2) PCT erachtet.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann darin gesehen werden, Kontrastmittel für die Darstellung von Lymphknotenveränderungen bereitzustellen, die spezifisch (mit dem N-terminalen Proteinende) an endotheliale Liganden binden. Die Anmelder hat gezeigt, daß dies mit Hilfe von Rezeptoren an deren C-terminalem Ende sich Signaleinheiten befinden, möglich ist. Diese Lösung wurde in keinem der zitierten Dokumente offenbart oder vorgeschlagen.

Daher beinhaltet der Gegenstand der Ansprüche 1-17, 22 eine erfinderische Tätigkeit gemäß Artikel 33(3) PCT.

Ansprüche 18-19, 20, 23

Die Merkmale (Bindung der Signaleinheit am C-terminalen Ende), die Anspruch 1 vom Stand der Technik unterscheiden, sind nicht in unabhängigen Ansprüchen 18, 20 und 23 enthalten.

Daher nimmt D3 die Neuheit der Ansprüche 18, 19, 20, 23 vorweg (Artikel 33(2) PCT).

Anspruch 21

Die Verwendung eines Polyhistidinrestes als Kopplungsgruppe ist in keinem der zitierten Dokumente beschrieben. Daher ist der Gegenstand des Anspruchs 21 neu (Artikel 33(2) PCT).

Anspruch 21 enthält jedoch kein Merkmal, das eine Kopplung der Signaleinheit am C-terminalen Ende des Rezeptors beinhaltet.

Daher enthält Anspruch 21 keine erfinderische Tätigkeit, die sich über die gesamte Breite des Anspruches erstreckt (Artikel 33(3) PCT).

Gewerbliche Anwendbarkeit

Ansprüche 1-23 erfüllen die Kriterien der Gewerblichen Anwendbarkeit (Artikel 33(4) PCT).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Die Rückbezüge der Ansprüche 16, 17, 19, 21 sind nicht klar gemäß Artikel 6 PCT.

Ansprüche 20 und 22 enthalten alle Merkmale des Anspruchs 18 und sind daher nicht richtig als ein von letzterem abhängiger Anspruch formuliert (Regel 6.4 PCT).

06-11-2001

Patentansprüche

1. Kontrastmittel zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen
Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen
Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind,
dadurch gekennzeichnet, daß das C-terminale Ende eines Rezeptors, eines
Rezeptorfragments oder einer Gruppe von Rezeptoren für spezifisch exprimierte
endotheliale Liganden an die Signaleinheit gekoppelt wird, während das die
Bindungsdomäne enthaltende N-terminale Ende von der Signaleinheit weg gerichtet
ist.
2. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor aus
mindestens 2 Molekülen besteht.
3. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens 2
Moleküle einen Abstand am N-terminalen Ende von 1-8 nm zeigen, oder aber
einen Abstand aufweisen, der dem Abstand der N-terminalen Enden von chimären
Molekülen entsprechen, also z.B. Rezeptoren die gegen die Fab-Fragmente von
Immunglobulingrundgerüsten substituiert wurden.
4. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein
L-Selectin-Derivat ist.
5. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor L-
Selectin ist.
6. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor eine
L-Selectin-Ig-Chimäre ist.
7. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit
ein paramagnetisches Teilchen enthält.
8. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit
ein superparamagnetisches Teilchen enthält.
9. Kontrastmittel gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit
ein superparamagnetisches Eisenoxidteilchen ist.
10. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit
ein mit Gas gefülltes Teilchen ist.
11. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit
ein paramagnetisches Metallatom enthält.

-2-

12. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein Schwermetallion enthält.
13. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein iodhaltiges Molekül enthält.
- 5 14. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein Radionuklid enthält.
15. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein Farbstoffmolekül enthält, welches Nahinfrarotstrahlung absorbiert.
16. Kontrastmittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß
10 der Rezeptor mit Hilfe einer Kopplungsgruppe an die Signaleinheit gekoppelt ist.
17. Kontrastmittel gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppe ein Polyhistidinrest ist.
18. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen
15 Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß ein multimerisierter Rezeptor, welcher an die endothelialen Liganden bindet, an eine Signaleinheit gekoppelt wird.
19. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der multimerisierte
20 Rezeptor eine L-Selectin-Ig-Chimäre ist.
20. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß
25 mehrere Rezeptoren, welche an die endothelialen Liganden binden, definiert und gerichtet mit Hilfe einer Kopplungsgruppe an eine Signaleinheit gekoppelt werden.
21. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppe ein Polyhistidinrest ist.
22. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von
30 Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der

-3-

- C-Terminus eines L-Selectin-Moleküls an ein Streptavidin-, Avidin- oder Biotinmolekül gekoppelt ist, die Signaleinheit ein Biotin-, Streptavidin- oder Avidinmolekül enthält, und die Kopplung durch die spezifische Bindung zwischen Streptavidin und Biotin bzw. Avidin und Biotin beim Zusammengeben der L-
- 5 . Selectin-Moleküle mit der Signaleinheit entsteht.
23. Verwendung von L-Selectin-Ig-Chimären zur Herstellung von Kontrastmitteln für die Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind.

RECEIVED SARET

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. März 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/17566 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation?: A61K 49/00, (74) Anwalt: MAGER, Knut; Müllerstrasse 178, 13342 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08693 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
6. September 2000 (06.09.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 43 710.6 8. September 1999 (08.09.1999) DE
100 13 849.7 15. März 2000 (15.03.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, 14050 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEBUS, Nils-Peter [DE/DE]; Friedrich-Karl-Str. 27, 13403 Berlin (DE). SYDOW, Sabine [DE/DE]; Kreuznacher Strasse 9, 14197 Berlin (DE). HOFMANN, Birte [DE/DE]; Fasanenstrasse 29, 10719 Berlin (DE). BRIEL, Andreas [DE/DE]; Gärtnerstrasse 25, 10245 Berlin (DE). RÖSSLING, Georg [DE/DE]; Niederbarnimstrasse 24, 16548 Glienicke (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 20. Dezember 2001
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/17566 A3

(54) Title: L-SELECTIN CONTRAST AGENTS

(54) Bezeichnung: L-SELECTIN-KONTRASTMITTEL

(57) Abstract: The invention relates to novel contrast agents for depicting changes in lymph nodes, depicting inflammatory processes, and pathological changes. The inventive contrast agents are bound to the specific expression of endothelial and/or leukocyte ligands. The invention also relates to a method for producing said contrast agents.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Kontrastmittel zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen und entzündlichen Prozessen sowie von pathologischen Veränderungen, die mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08693

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K49/00 A61K49/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 18498 A (MARSDEN JOHN CHRISTOPHER ;GODAL ASLAK (NO); HOEGSET ANDERS (NO); K) 7 May 1998 (1998-05-07) claims 1,11-13,19	1-7,11, 17,21,24
X	WO 98 18501 A (MARSDEN JOHN CHRISTOPHER ;HELLEBUST HALLDIS (NO); HOFF LARS (NO);) 7 May 1998 (1998-05-07) page 47, line 10 -page 49, line 20; claims 1,11,12 page 50, line 5	1-7,11, 17,21,24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 August 2001

Date of mailing of the international search report

27/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No
PCT/EP 00/08693

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIKUTA, AKIO ET AL: "Localization of ligands for L- selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates" BLOOD (1994), 84(11), 3766-75 , XP001015464 abstract; figures 1,2 page 3769, column 1 page 3773, column 1, paragraph 2 ---	1-7,13, 17,21,24
Y	WATSON, SUSAN R. ET AL: "A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules" J. CELL BIOL. (1990), 110(6), 2221-9 , XP001015456 abstract ---	1-24
Y	WO 94 00477 A (GLYCOMED INC) 6 January 1994 (1994-01-06) example 14 ---	1-24
Y	WO 99 32154 A (SCHERING AG) 1 July 1999 (1999-07-01) cited in the application claims -----	1-24

INTER' TIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08693

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9818498 A	07-05-1998	AU 4786897 A	22-05-1998
		AU 4786997 A	22-05-1998
		AU 4787097 A	22-05-1998
		EP 0971747 A	19-01-2000
		EP 0946202 A	06-10-1999
		EP 0963209 A	15-12-1999
		WO 9818496 A	07-05-1998
		WO 9818497 A	07-05-1998
		JP 2001502719 T	27-02-2001
		US 6264914 B	24-07-2001
		US 6051207 A	18-04-2000
		AU 733495 B	17-05-2001
		AU 4786697 A	22-05-1998
		AU 4786797 A	22-05-1998
		BG 103438 A	31-01-2000
		BR 9712683 A	19-10-1999
		CN 1234742 A	10-11-1999
		CZ 9901494 A	15-09-1999
		EP 0973552 A	26-01-2000
		EP 0991427 A	12-04-2000
		WO 9818501 A	07-05-1998
		WO 9818495 A	07-05-1998
		JP 2001503407 T	13-03-2001
		NO 991889 A	28-06-1999
		US 6264917 B	24-07-2001
		US 6261537 B	17-07-2001
		AU 733477 B	17-05-2001
		AU 4718297 A	22-05-1998
		BG 103439 A	31-01-2000
		BR 9713978 A	02-05-2000
		CN 1238700 A	15-12-1999
		EP 1007101 A	14-06-2000
		WO 9818500 A	07-05-1998
		HU 0000357 A	28-06-2000
		NO 991890 A	28-06-1999
		AU 7068798 A	13-11-1998
		EP 0977600 A	09-02-2000
		WO 9847541 A	29-10-1998
		HU 9904595 A	28-04-2000
		US 6209367 B	03-04-2001
WO 9818501 A	07-05-1998	AU 733495 B	17-05-2001
		AU 4786697 A	22-05-1998
		AU 4786897 A	22-05-1998
		AU 4786997 A	22-05-1998
		BG 103438 A	31-01-2000
		BR 9712683 A	19-10-1999
		CN 1234742 A	10-11-1999
		CZ 9901494 A	15-09-1999
		EP 0973552 A	26-01-2000
		EP 0971747 A	19-01-2000
		EP 0946202 A	06-10-1999
		WO 9818496 A	07-05-1998
		WO 9818497 A	07-05-1998
		JP 2001503407 T	13-03-2001
		NO 991889 A	28-06-1999
		US 6264914 B	24-07-2001
		US 6051207 A	18-04-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/EP 00/08693

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9818501 A		US 6264917 B	24-07-2001
		US 6261537 B	17-07-2001
		AU 4786797 A	22-05-1998
		AU 4787097 A	22-05-1998
		EP 0991427 A	12-04-2000
		EP 0963209 A	15-12-1999
		WO 9818495 A	07-05-1998
		WO 9818498 A	07-05-1998
		JP 2001502719 T	27-02-2001
		AU 733477 B	17-05-2001
		AU 4718297 A	22-05-1998
		BG 103439 A	31-01-2000
		BR 9713978 A	02-05-2000
		CN 1238700 A	15-12-1999
		EP 1007101 A	14-06-2000
		WO 9818500 A	07-05-1998
		HU 0000357 A	28-06-2000
		NO 991890 A	28-06-1999
		AU 7068798 A	13-11-1998
		EP 0977600 A	09-02-2000
		WO 9847541 A	29-10-1998
		HU 9904595 A	28-04-2000
WO 9400477 A	06-01-1994	AU 678373 B	29-05-1997
		AU 4652693 A	24-01-1994
		CA 2138645 A	06-01-1994
		EP 0648223 A	19-04-1995
		JP 8500820 T	30-01-1996
		US 5591835 A	07-01-1997
		US 5728685 A	17-03-1998
WO 9932154 A	01-07-1999	DE 19758105 A	24-06-1999
		AU 2268099 A	12-07-1999
		EP 1037672 A	27-09-2000

L-Selectin-Kontrastmittel

Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der Kontrastmittel zur bildgebenden Diagnostik und beschreibt neue Kontrastmittel zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen und entzündlichen Prozessen sowie von pathologischen Veränderungen, die mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind.

Unter endothelialen und leukozytären Liganden werden im folgenden die Liganden in den Lymphknoten Sgp50/GlyCAM-1, (Imai et al., 1993), CD34 (Baumheter et al., 1993), MadCAM-1 (Berg et al., 1993), Sgp200 (Hemmerich et al., 1994), die Liganden auf Leukozyten PSGL-1 (Moore et al., 1992) und KG1a-Ligand (Sackstein et al., 1997) sowie die L-Selectinliganden auf entzündeten vaskulären Endothelien (Zakrzewicz et al., 1997; Girard und Springer, 1995) verstanden.

Als bildgebende Verfahren können die Kernspintomographie, Ultraschallbildgebung, Bildgebung unter Verwendung von Röntgenstrahlen (Röntgen oder Computertomographie), szintigraphische Bildgebung unter Verwendung von Radionukliden (Gammakamerabildgebung, SPECT, PET) und die Bildgebung mittels Nahinfrarotstrahlung (NIR-Strahlung) dienen.

Lymphknotenveränderungen werden bisher mittels Bildgebung unter Verwendung von Röntgenstrahlen (Computertomographie) aufgrund der Volumenzunahme diagnostiziert oder in der Kernspintomographie durch Gabe von Kontrastmitteln dargestellt, die von Makrophagenpopulationen des Lymphknotens unspezifisch aufgenommen werden (Magnetite bzw. hochmolekulare gadoliniumhaltige Kontrastmittel für die Magnetresonanzbildgebung).

Entzündliche Prozesse werden bisher unspezifisch durch den Nachweis des erhöhten Austritts von Plasmaflüssigkeit in das entzündete Gewebe direkt oder unter assistierender Kontrastmitteigabe dargestellt. Alternativ können derartige Prozesse auch durch Leukozytenpopulationen diagnostiziert werden, die vorher mit geeigneten

-2-

Signalmolekülen in vitro oder in vivo markiert wurden. Als Signalmoleküle dienen dabei spezifische radionuklidmarkierte Antikörper gegen Leukozytenoberflächenantigene oder Magnetite, die von bestimmten Leukozytenpopulationen in vitro phagozytiert wurden.

- 5 Alle diese Verfahren versuchen, Lymphknotenveränderungen und entzündliche Prozesse indirekt darzustellen.
- Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existiert kein nachweislich funktionierender direkter und spezifischer Nachweis von Lymphknotenveränderungen und entzündlichen Prozessen sowie von pathologischen Veränderungen, die mit der spezifischen Expression von
- 10 endothelialen Liganden verbunden sind, mittels bildgebender Diagnostik.

- Die Internationale Patentanmeldung WO 93/06835 beschreibt ein Adhäsionsmolekül auf Leukozyten, sogenanntes L-Selectin, und gibt bereits Hinweise auf dessen Verwendung zur Darstellung von entzündlichen Prozessen. Insbesondere wird die
- 15 Struktur der cDNA-Nukleotidsequenz dieses Moleküls und der entsprechenden Aminosäuresequenz offenbart. Es wird vorgeschlagen, dieses Protein als Kontrastmittel zur Darstellung von entzündlichen Prozessen zu benutzen, indem man das Protein mit Radionukliden oder paramagnetischen Substanzen markiert. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung derartiger Kontrastmittel fehlt allerdings. Es
- 20 gibt keine Hinweise darauf, wie die Markierung der Proteine erfolgen soll, und auch keine Beispiele dafür, daß die markierten Proteine tatsächlich in vivo den gewünschten Effekt zeigen.

- Es besteht nach wie vor ein großer Bedarf an spezifischen Kontrastmitteln für die
- 25 Darstellung von Lymphknotenveränderungen oder entzündlichen Prozessen sowie ein Bedarf an spezifischen Mitteln zur Darstellung von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen Liganden verbunden sind.

- Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, diese spezifischen Kontrastmittel
- 30 sowie Verfahren zu deren Herstellung bereitzustellen.

-3-

Diese Aufgabe wird mit den neuen Kontrastmitteln und den Verfahren zu deren Herstellung gelöst.

- Die neuen Kontrastmittel enthalten einen Rezeptor. z.B. Adhäsionsmoleküle wie das
- 5 L-Selectin-Molekül. in seiner biologisch korrekten räumlichen Ausrichtung, so daß das Kontrastmittel spezifisch und selektiv an endotheliale Liganden binden kann. Biologisch korrekte Ausrichtung bedeutet, daß das N-terminale Proteinende mit der ligandenbindungsfähigen Lektin-Domäne nach außen, von der Zelle oder von einem Träger oder der Signaleinheit weg zeigt, während das C-terminale Proteinende der
- 10 vollständigen oder einer verkürzten Proteinsequenz in die Zelle bzw. nach innen zur Zelle oder zu einem Träger oder zu der Signaleinheit hin zeigt. Unter dem Begriff Rezeptor wird eine molekulare Einheit verstanden, welche spezifisch an die oben definierten endothelialen und leukozytären Liganden bindet.
- 15 Besonders überraschend war die Erkenntnis, daß das Kontrastmittel dann besonders gut an seine Zielstruktur bindet, wenn der Rezeptor als Multimer vorliegt. Das bedeutet, daß das Kontrastmittel bevorzugt dann an die endothelialen Liganden bindet, wenn wenigstens zwei Adhäsionsmoleküle, z.B. zwei L-Selectin-Moleküle, definiert und gerichtet an eine Signaleinheit gekoppelt sind.
- 20 Die Erfindung betrifft daher Kontrastmittel zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen Liganden verbunden sind. und welche dadurch gekennzeichnet sind. daß ein Rezeptor. ein
- 25 Rezeptorfragment oder eine Gruppe von Rezeptoren für spezifisch exprimierte endotheliale und/oder leukozytäre Liganden in definierter Ausrichtung an eine Signaleinheit gekoppelt sind. Der Rezeptor ist bevorzugt ein L-Selectin-Molekül, ein L-Selectin-Derivat oder ein Fragment von L-Selectin. Die Signaleinheiten variieren je nach Verwendungszweck: für die Kernspintomographie muß die Signaleinheit aus
- 30 paramagnetischen oder superparamagnetischen Teilchen bestehen, bevorzugt sind superparamagnetische Eisenoxidteilchen. Für diesen Verwendungszweck können auch Gadoliniumkomplexe oder sonstige paramagnetische Metallkomplexe verwendet

werden. Für die Bildgebung mittels Röntgenstrahlen werden bevorzugt iodhaltige Moleküle oder solche mit Schwermetallatomen verwendet. Für die Ultraschallbildgebung werden stabilisierte Gasbläschen eingesetzt. In der Radiodiagnostik verwendet man Radionuklide als Signaleinheit. Schließlich können

5 Nahinfrarotfarbstoffe als Signaleinheiten für Kontrastmittel in der Nahinfrarotdiagnostik eingesetzt werden.

Die Multimerisierung des Rezeptors kann auf zweierlei Weise erfolgen. Erstens können mehrere Rezeptoren (z.B. L-Selectin) definiert und gerichtet an eine

10 Signaleinheit gekoppelt werden. Zweitens können bereits multimerisierte Rezeptoren (z.B. multimeres L-Selectin) an die Signaleinheit gekoppelt werden.

a) Gerichtete Kopplung des Rezeptors an die Signaleinheit

15 Um eine gerichtete Kopplung monomeren L-Selectins an partikuläre Träger zu ermöglichen, wurden Proteinformen erstellt, die am C-Terminus mit einer Kopplungsgruppe versehen sind, um so die korrekte räumliche Ausrichtung zu gewährleisten (Beispiel 2). Eine Kopplungsstruktur, die die Anforderungen von hoher Affinität und geringer Größe optimal erfüllt, ist der Polyhistidin-Tag (multi-His, z.B. bestehend aus

20 4 oder mehr Histidinmolekülen), der mit Ni- oder Co-komplexierten Chelatoren (im folgenden vereinfacht Nickelchelator genannt) interagiert.

Die gerichtete Kopplung kann erfolgen, indem ein multi-His-getaggttes Selectin über z. B. Ni^{2+} -Ionen an einen geeigneten Chelator gebunden wird. Die Chelatoren werden

25 dazu an die Signaleinheit gekoppelt. Ist die Signaleinheit ein ferrimagnetisches Nanopartikel, wie z.B. ein Dextranmagnetit, so erfolgt die Kopplung durch Oxidation mit Natriumperiodat. Die Kopplungschemie basiert auf der Oxidation von Diolgruppen, die in Carboxydextran vorliegen. Da derartige Diolgruppen auch in Stärke vorliegen, sind auch solche ferrimagnetischen Nanopartikel geeignet, deren Hüllmaterialien aus

30 Stärke, Carboxydextran oder vergleichbaren Materialien bestehen. Weiterhin können die Chelatoren an mit Dextran oder vergleichbaren Hüllmaterialien beschichteten nichtradioaktiven und radioaktiven Kolloidpartikeln gekoppelt werden. Die Chelatoren

können ebenfalls an kompakte oder gefüllte oberflächenmodifizierte Polymerkugeln gekoppelt werden. Die Füllung der Polymerkugeln kann aus einem Gas, einem röntgendichten Material, einer radioaktiven Substanz oder Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. NIR-Farbstoffen bestehen. Die Chelatoren können auch an Dendrimerstrukturen
5 gekoppelt werden, die wiederum mit fluoreszierenden Farbstoffen, röntgendichten, paramagnetischen, ferrimagnetischen Signaleinheiten oder mit gasgefüllten oberflächenmodifizierten polymeren Signalmolekülen dotiert sind.

Die an partikuläre Träger (Nanopartikel, Kolloidpartikel, Polymerkugeln) gekoppelten Chelatoren, welche die Bindung an die multi-His-modifizierten Rezeptoren
10 ermöglichen, können radioaktive Metalle oder Metallionen enthalten, die in der diagnostischen Bildgebung ein Signal geben.

Die gerichtete Kopplung von Selectinen kann weiterhin über andere molekulare Eigenschaften erreicht werden. So können beispielsweise die Signaleinheiten auf ihrer Oberfläche oder an ihrer Struktur Streptavidin oder andere Avidinvarianten tragen und
15 biotinylierte Selectine binden und umgekehrt. An die Signaleinheiten kann auch ein selectinspezifischer Antikörper gekoppelt werden, der außerhalb des aktiven Zentrums des Selectins bindet, und somit dessen Bindungsfähigkeit nach Kopplung an die Signalpartikel nicht zerstört. Ein weiteres Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kontrastmittel besteht daher darin, daß der C-Terminus eines L-
20 Selectin-Moleküls an ein Streptavidin-, Avidin- oder Biotinmolekül gekoppelt ist, die Signaleinheit ein Biotin-, Streptavidin- oder Avidinmolekül enthält, und die Kopplung durch die spezifische Bindung zwischen Streptavidin und Biotin bzw. Avidin und Biotin beim Zusammengeben der L-Selectin-Moleküle mit der Signaleinheit entsteht.

25 **b) Kopplung mit Hilfe multimerisierter Rezeptoren**

Eine zweite Möglichkeit, L-Selectin-Moleküle gerichtet an eine Signaleinheit zu koppeln, ist, L-Selectin-Chimären zu verwenden (Beispiel 3). L-Selectin-Ig-Chimären bestehen aus L-Selectin und Immunglobulindomänen. Dabei bestimmt die Art des
30 verwendeten Immunglobulinfragmentes (Ig) den Multimerisierungsgrad der Chimären: Ig der γ -Klasse tragen 2 Fab-Fragmente, die gegen L-Selectin ausgetauscht wurden. Somit tragen L-Selectin-IgG-Chimären 2 L-Selectinfragmente pro Molekül.

-6-

Ig der μ -Klasse tragen bis zu 10 Fab-Fragmente, die gegen L-Selectin ausgetauscht wurden. Folglich tragen die L-Selectin-IgM-Chimären bis zu 10 L-Selectinfragmente pro Molekül. Der Abstand der Ligandenbindungszentren der L-Selectine in den Chimärenuntereinheiten entspricht dem ursprünglichen Abstand der Fab-Fragmente und beträgt im allgemeinen zwischen 1 und 8 nm, meist ca. 5 nm.

Chimäre Moleküle können auch aus L-Selectin und weiteren multimerisierenden Proteinen gebildet werden. Das Mannose-binding-Protein kann, bestehend aus 4 Untereinheiten, somit mit 4 L-Selectin-Einheiten dotiert werden. Das cartilage oligomeric matrix Protein (COMP, Tomschy et al., 1996) wiederum besteht aus 5 Untereinheiten, die N-terminal mit dem C-terminalen Ende des L-Selectins verknüpft werden können.

Die chimären Moleküle aus Selectin und dem Fc-Teil von Antikörpern können entweder über einen Antikörper gegen den Fc-Teil oder über Protein A, Protein L bzw. Protein G - bakterielle Zellwandmoleküle, die den Fc-Teil von Immunglobulinen binden - gerichtet (und bereits multimerisiert!) an Partikeloberflächen gebunden werden. Die Kopplung von Protein G an die Oberfläche von Dextranmagnetiten wird in Beispiel 14 beschrieben.

Alle oben genannten chimären Moleküle aus Selectin und einem Multimerisierungsteil können am C-terminalen Ende weitere Modifikationen tragen, z.B. einen multi-His-tag (Beispiel 4), an den wiederum Chelatoren binden können, die ihrerseits an Signaleinheiten gekoppelt sind, wie in Beispiel 5 beschrieben.

Mit dem Rezeptor oder den Rezeptorgruppen sind verschiedene Signaleinheiten verbunden, je nachdem, in welchem diagnostischen Verfahren das Kontrastmittel verwendet werden soll.

Zum Beispiel können als Signaleinheiten ferrimagnetische Partikel (Magnetite, Ferrite, Cobaltferrite u.ä.) verwendet werden, die aus einem monokristallinen ferrimagnetischen Kern und aus einer Hülle bestehen (Beispiel 13 und 14). Die Hülle ist kovalent mit dem Kern verbunden oder umschließt den Kern vollständig ohne direkte chemische Bindung. Die Hülle kann aus Dextran, Stärke oder nieder- oder

hochmolekularen aliphatischen oder aromatischen Ketten bestehen. Die Hülle verfügt entweder direkt über funktionelle Gruppen (Amino-, Carboxyl-, Thiolgruppen, o.ä.), die zur weiteren Kopplung verwendet werden können, oder über Gruppen, die nach chemischer Aktivierung zur weiteren Kopplung funktionalisiert werden. Derartige
5 Verbindungen sind z.B. in WO 92/12735, WO 92/22586, EP 0 186 616 und der US 4,101,435 beschrieben.

Es können auch Verbindungen verwendet werden, die aus der Kombination von ferrimagnetischen Partikeln und daran kovalent gekoppelten Verbindungen bestehen, wobei die kovalent gekoppelten Verbindungen mit funktionellen Gruppen versehen
10 sein können oder dotierbare längerkettige aliphatische Verbindungen enthalten können.

Als Signaleinheiten können ferner paramagnetische Metalle und Metallverbindungen eingesetzt werden (insbesondere Gadoliniumkomplexe). Hierbei wird das Metallatom von einem Chelator komplexiert, der darüber hinaus direkt oder über einen Träger
15 vermittelt weitere funktionelle Gruppen (Amino-, Carboxyl-, Thiolgruppen, o.ä.) aufweist, die zur weiteren Kopplung verwendet werden können. Der Chelator kann hierbei auch auf Dendrimeren dotiert sein (Beispiel 15), wie sie z.B. in DE 43 444 60 beschrieben werden.

Die genannten Anforderungen werden auch von Verbindungen erfüllt, die aus der
20 Kombination von Chelator und einem weiteren Element bestehen, das seinerseits funktionelle Gruppen aufweist, die zur weiteren Kopplung verwendet werden können. Erfindungsgemäß können als solches Element dotierbare Dendrimere, dotierbare längerkettige aliphatische Verbindungen oder dotierbare Partikel mit einem Durchmesser von 4-200 nm, bestehend aus Magnetiten, Polystyren, Dextran, Stärke
25 usw. verwendet werden.

Als Signaleinheiten können röntgendichte Moleküle (z.B. Iod-Verbindungen), Metalle, Metallverbindungen und Kolloide (z.B. kolloidale Goldpartikel, siehe Beispiel 6, 7 bzw. 12) eingesetzt werden. Hierbei werden die Rezeptoren oder Rezeptorgruppen mit
30 den röntgendichten Substanzen in Analogie zum oben genannten direkt oder indirekt verbunden. So werden iodhaltige Verbindungen mit Kopplungsgruppen eingesetzt, an die Chelatoren zur Bindung von multi-His-L-Selectinen oder Fc-bindende Substanzen

-8-

zur Bindung von L-Selectin-Chimären gekoppelt wurden. Indirekt verbunden bedeutet, daß die röntgendichten Moleküle in Signaleinheiten eingelagert werden, wobei letztere mit den Rezeptoren oder Rezeptorgruppen direkt verbunden werden.

5 Als Signaleinheiten können radioaktive Moleküle, Metalle, Metallverbindungen und Kolloide (z.B. kolloidale ^{198}Au - oder ^{199}Au -Partikel, siehe Beispiel 10 und 11) dienen, die in Analogie zum oben genannten an die Rezeptoren oder Rezeptorgruppen gebunden werden.

10 Die Bindung von L-Selectin an seine Liganden erfolgt bevorzugt unter Scherkrafteinfluß (Finger et al., 1996). Werden partikuläre Signaleinheiten an L-Selectin gekoppelt, so werden dadurch zusätzlich Scherkräfte induziert, die zu einer verbesserten Bindung des L-Selectin-Partikel-Konstruktes im Vergleich zu reinem L-Selectin führen (siehe Beispiel 8).

15

Als Signaleinheiten können fluoreszierende Farbstoffe (z.B. NIR-Farbstoffe) verwendet werden. Diese können entweder direkt in Analogie zum oben genannten an die Rezeptoren oder Rezeptorgruppen gekoppelt werden, oder indirekt mit diesen verbunden werden (Beispiel 18 und 19). So können die Farbstoffe in Dendrimere

20

dotiert werden, in kompakte oder hohle farbstoffenthaltende Polymerpartikeln eingebunden werden oder direkt an Substanzen (Protein A, Protein L, Protein G oder spezifische gegen die Multimerisierungsdomäne gerichtete Antikörper) gekoppelt werden, die wiederum an die Multimerisierungsdomänen chimärer L-Selectinmoleküle binden. Geeignete Farbstoffmoleküle und deren Herstellung werden z.B. in WO

25

96/17628 beschrieben.

Als Signaleinheiten können gasgefüllte oberflächenmodifizierte Polymerkugeln genutzt werden, die in Analogie zum oben genannten an die Rezeptoren oder Rezeptorgruppen gekoppelt werden (siehe Beispiele 20 bis 22).

30

Beispiele

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Klonierung und Expression von L-Selectin

- 5 Aus der lgt10 cDNA Bank der humanen Lymphomzelllinie Raji wurde ein Klon isoliert, der den gesamten kodierenden Bereich von L-Selectin enthält und von 5'- und 3'- nicht translatierten Bereichen flankiert ist. Dieser wurde in den pCRII-Vektor des TA-CloningSystems® integriert. Das daraus resultierende Konstrukt wurde als LamTA4 bezeichnet und bildete die Grundlage für die Herstellung der L-Selectin
- 10 Konstrukte. Dabei ergibt sich die Abkürzung zur Benennung (siehe auch die Internationale Patentanmeldung WO 93/06835) des L-Selectin Konstruktes aus dem einklonierten Sequenzabschnitt. "sL" steht für "soluble" L-Selectin, das der löslichen Form des Moleküls entspricht, wie sie im humanen Serum vorkommt. Diese Form enthält die Lectin-, die EGF und 2 SCR-Domänen. Dagegen fehlen dieser Form die
- 15 cytoplasmatische und die transmembranäre Domäne, wobei bei der Konstruktion die physiologische Schnittstelle, an der sL-Selectin von der Zelloberfläche proteolytisch abgetrennt wird, eingehalten wird. Das sL-Fragment wurde mittels PCR aus dem Ausgangsklon LamTA4 generiert und wieder in den Vektor pCRII des TA-CloningSystems® integriert. Das rekombinante sL-Selectin wurde in einer
- 20 glykosylierten Form wie folgt hergestellt. Der sL-Selectin Sequenzabschnitt wurde in den Vektor pCR3.1 des TA CloningSystems® für die Expression in K562-Zellen und in den Vektor pMPSV-HE für die Expression in BHK-Zellen einkloniert. Anschließend wurden Klone isoliert und mittels Geneticin (im Falle des pCR3.1-Vektors) bzw. nach Kotransfektion mit Puromycin-resistenzvermittelnden Vektoren
- 25 (im Falle des pMPSV-HE-Vektors) selektiert. Die Kulturüberstände von L-Selectin-sezierenden K562- bzw. BHK-Zellen wurden mittels Immunaффinitätschromatographie über CNBr aktivierte Sepharose-Matrix, an die der Antikörper DREG200 (Kishimoto et al., 1990) gebunden wurde, gereinigt. Die Quantifizierung der Mengen von L-Selectin zur Bestimmung der Ausbeute erfolgte
- 30 mittels ELISA unter Verwendung der Antikörper DREG200 und DREG55 (Kishimoto et al., 1990).

Beispiel 2: Klonierung und Expression von multi-His-L-Selectin

Unter Verwendung eines partiell komplementären PCR-Primers, der zusätzlich die Sequenz von sechs Histidinen (multi-His) trägt, wurde ausgehend von dem Ursprungsklon LamTA4 (siehe Beispiel 1) ein L-Selectin-Konstrukt mit C-terminaler Kopplungsgruppe generiert. Das sL-Selectin-multi-His-Fragment (kodiert das Protein multi-His-L-Selectin) wurde in die Expressionsvektoren pCR 3.1 (Invitrogen) und unter Berücksichtigung des Leserasters in SRa-GS-Seq (Berlex Lab., Inc.) und den Baculo Transfer Vektor pBBS 250 (Berlex Lab., Inc.) einkloniert. BHK-Zellen wurden mit multi-His-sL-Selectin-Konstrukt unter Zugabe eines Genitacin-resistenzvermittelnden Vektors transfiziert. Es wurden Klone isoliert, die in die Kulturüberstände das Protein multi-His-L-Selectin sezernieren.

Zur Expression des multi-His-L-Selectins in Insektenzellen wurde das multi-His-sL-Selectin-Konstrukt in den Baculo Transfer Vektors überführt und anschließend in das virale Genom transferiert. Mit diesen rekombinanten Viren wurden Sf9-, High Five™ und Estigmena acraea-Zellen infiziert. Die rekombinanten Proteine wurden, wie im Beispiel 1 beschrieben, mittels Immunaффinitätschromatographie an DREG200 gereinigt.

Beispiel 3: Herstellung und Expression von L-Selectin-Ig-Chimären

Die L-Selectin-IgG-Chimären, die pro Molekül 2 L-Selectine tragen, wurden von folgenden Konstrukten ausgehend hergestellt: Maus-L-Selectin-Humane-IgG-Chimäre (hIgG-mLS) im pCMV5-Expressionsvektor (Watson et al., 1990), Ratten-L-Selectin-Humane-IgG-Chimäre (hIgG-rLS) im pCDM8-Expressionsvektor (Tamatani et al., 1993), Humane-L-Selectin-Humane-IgG-Chimäre (hIgG-hLS) im pCMV5-Expressionsvektor (Mebius und Watson, 1993). Immunglobuline der μ -Klasse tragen 5 μ -globulinähnliche sternförmig angeordnete Moleküle und somit 10 Fab-Fragmente, die gegen L-Selectin ausgetauscht wurden. Somit tragen L-Selectin-IgM-Chimären 10 L-Selectinfragmente pro Molekül. Ausgehend von einem Konstrukt im pCDM8-Expressionsvektor wurde die Maus-L-Selectin-Humane-IgM-Chimäre hergestellt (Maly et al., 1996).

Die rekombinanten Expressionsvektoren wurden in E. coli amplifiziert, gereinigt und anschließend in eukaryotische Zellen transfiziert.

- Die rekombinanten Vektoren der Maus-L-Selectin-Humane-IgM-Chimären wurden in COS-7 und in CHO-K1 Zellen mit einem Genitacin-resistenzvermittelnden Vektor kotransfiziert. Stabil produzierende Klone beider Zelllinien wurden isoliert. Zusätzlich wurde das cDNA-Fragment, das für das Chimärenprotein kodiert, mit
- 5 Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor pCDM8 herausgeschnitten und in den Vektor pcDNA3 subkloniert. Mit diesem Konstrukt wurden HEK293 Zellen transfiziert und Klone isoliert. Die Aufreinigung der hIgM-mLS Chimären erfolgte mittels Immunaффinitätschromatographie an MEL-14 (Bowen et al., 1990). Die Produktion und Reinigung der Chimären wurde mittels ELISAs verfolgt (MEL-14 als
- 10 Fangantikörper und anti-hIgG-Phosphatase als Detektionsantikörper). Die IgG-Chimären (Human-, Ratten- und Maus-L-Selectin-Humane-IgG-Chimären) wurden durch Kotransfektion mit dem Vektor pcDNA3 in stabil produzierenden HEK293 und CHO-K1 Zellen hergestellt. Die Aufreinigung der hIgG-LS Chimären erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Protein G (Pharmacia): Nach dem
- 15 Auftragen des Kulturüberstandes auf die Säule, wurde die Matrix mit 20 mM Natriumphosphat (pH 7,0) gewaschen. Eluiert wurde mit 0,1 M Glycin (pH 2,5), die Eluate wurden mit gesättigter K_2HPO_4 -Lösung neutralisiert.

Beispiel 4: Herstellung und Expression von L-Selectin-Ig-multi-His-Chimären

- 20 Die Maus-L-Selectin-Humane-IgG-Chimäre (hIgG-mLS) im pCMV5-Expressionsvektor (siehe Beispiel 3) wurde unter Verwendung eines partiell komplementären PCR-Primers, der zusätzlich die Sequenz von sechs Histidinen (multi-His) trägt, um eine am Fc-Fragment der Chimäre ansetzende C-terminale Histidin-Kopplungsgruppe verlängert (siehe Beispiel 2). Die Amplifikation, Reinigung
- 25 und Transfektion des rekombinanten Expressionsvektors sowie die Isolierung von stabil produzierenden HEK293 Zellklonen erfolgte, ebenso wie die Produktion und Reinigung der multi-His-Chimären in Analogie zu der im Beispiel 3 beschriebenen Prozedur.

Beispiel 5: Synthese von radioaktiven Chelator-Signaleinheiten und Kopplung von multi-His-L-Selectinen als szintigraphische Kontrastmittel

U.a. sind Calcein und Newport Green (Molecular Probes, Inc.) Nickelionen komplexierende Chelatoren, die an multi-His-Proteine binden können. Darüber hinaus
5 sind Calcein und Newport Green iodierbar und können so als Signaleinheit zur szintigraphischen Bildgebung eingesetzt werden. Mit 1 nMol Newport Green wurden 10 µl 0,25 M Phosphatpuffer pH 6,5-7,5 (Iodierungspuffer), der 0,2 mCi Na¹²⁵I enthielt, sowie 5 µl Chloramin T (8 mg/ml in Iodierungspuffer) für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Na₂S₂O₃ (8
10 mg/ml in Iodierungspuffer) sowie von 100 µl NaI (2 mg/ml in Iodierungspuffer) beendet. Anschließend wurden 1 nMol L-Selectin-IgG-multi-His-Chimäre (hergestellt nach Beispiel 4) und 1 µl 50 mM NiAcetat (50 nMol) zum iodierten Newport Green hinzugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Produkt (L-Selectin-IgG-multi-His-Chimäre)-(Ni)-(Newport Green)-(¹²⁵I) über eine PD10-
15 Säule in Phosphatpuffer von den niedermolekularen Substanzen (Nickelionen, ungebundenem Newport Green sowie Iodierungsreaktiven) gereinigt. Der Erhalt der Bindungsfähigkeit der iodierten L-Selectin-Chimäre wurde auf Cryoschnitten mit anschließender Mikroautoradiographie nachgewiesen.

Beispiel 6: Synthese von kolloidalem Gold

Für einen 100 ml Ansatz wurden 80 ml aqua dest. und 50 µl 20% HAuCl₄ vorgelegt und auf 60°C erwärmt. Nach Zugabe einer Lösung, die 4 ml 1% NaCitrat, 18 ml aqua
dest. sowie 80 µl 1% Tannin enthielt, wurde das Reaktionsgemisch auf 95°C für 10 Minuten erhitzt. Der Farbumschlag der Lösung von gelb zu rot zeigt die Bildung der
25 Kolloidteilchen. Das Produkt wurde abgekühlt und sterilfiltriert. Der Durchmesser der Kolloide beträgt 8-12 nm.

Beispiel 7: Synthese von L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-kolloidalem Gold-Konstrukten

30 Zu 10 ml kolloidalem Gold (Herstellung siehe Beispiel 6) wurden 300 µl Protein G (2 mg/ml. in aqua dest) für 1 Stunde bei Raumtemperatur gegeben. Freies, in Lösung vorliegendes ungebundenes Protein G wurde durch mehrfaches Waschen gegen Puffer

-13-

- (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl), mittels Zentrifugation bei 30.000 g mit einem Sorvall 80AT3-Rotor abgetrennt. Die Protein G-Goldkolloide wurden in 300 μ l Puffer aufgenommen. Durch Tracermessungen konnte gezeigt werden, daß ca. 15 Protein G-Moleküle auf einem 10 nm kolloidalem Goldpartikel gebunden wurden.
- 5 Anschließend wurden die IgG-Selectinchimären an diese Konstrukte gekoppelt. 50 μ g Maus- oder Ratten-L-Selectin-IgG-Chimäre wurden zu je 300 μ l Protein G-kolloidales Gold gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur konnten ca. 80-90 % der eingesetzten Chimärenmenge an die Protein G-Goldkolloide gebunden werden. Die Bindungsfähigkeit der IgG-Selectinchimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukte an L-
- 10 Selectinliganden wurde an Gefrierschnitten peripherer Lymphknoten und anschließender Silberfärbung gezeigt.

Beispiel 8: Surface plasmon resonance (SPR) Messungen mit L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-kolloidalem Gold-Konstrukten

- 15 Maus- bzw. Ratten-L-Selectinchimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukte (Herstellung siehe Beispiel 7) wurden mit BIAcore Laufpuffer HBS+Ca²⁺ (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,005% P20; 1 mM CaCl₂) einhundertfach verdünnt. Als Negativkontrolle wurden die Konstrukte in HBS ohne Ca²⁺ Zugabe verdünnt. Anschließend wurden die Substanzen über einen SA-Pioneer-Chip (BIAcore 2000 / BIAcore AB, Freiburg) bei
- 20 einer Flußgeschwindigkeit von 20 μ l/min gegeben. Vorher wurden die Flußzellen mit jeweils 100 RU multivalenten Polyacrylamid-Biotin-derivatisierten Liganden (Syntesome GmbH, München) beladen: Fc-1 = N-Acetylactosamin (Negativkontrolle), Fc-2 = sialyl-Lewis^x (L-Selectinligand), Fc-3 = Sulfo-Tyrosin-sialyl-Lewis^x (optimierter L-Selectinligand). Die Bindung der L-Selectinchimären-Goldkolloid-Konstrukte erfolgte
- 25 ausschließlich bei Anwesenheit von Calciumionen an Fc-2 mit 250 RU, an Fc-3 mit 700 RU. Ohne Zugabe von Calcium bzw. bei Verwendung von reinen L-Selectinchimären (ohne Goldkolloidbeladung) wurde keine Bindung bzw. Meßsignale im Bereich von 1 RU festgestellt.

Beispiel 9: Wirknachweis mit L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukten

NMRI-Mäusen wurde je Tier 12 µg Maus- bzw. Ratten-L-Selectinchimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukte (Herstellung siehe Beispiel 7; Stoffmenge bezogen auf den L-Selectinchimärenanteil) bzw. als Kontrolle unbeladene Protein G-Goldkolloid-Konstrukte intravenös injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die peripheren Lymphknoten entnommen und in Gefrierschnitten mit nachfolgender Silberfärbung analysiert. Direkt nach dem "first pass" bis zu einem Zeitraum von 30 Minuten nach Injektion konnten im Falle der mit Selectinchimären-Konstrukten behandelten Tiere Goldkolloide an der luminalen Seite der hochendothelialen Venolen im Lymphknoten nachgewiesen werden. Tiere, die die Kontrollsubstanz erhielten, zeigten keinerlei Goldkolloide in den Lymphknoten.

Beispiel 10: Synthese von ¹⁹⁸Au-Kolloid-Protein G-L-Selectin-Ig-Chimären-Konstrukten (als szintigraphisches Kontrastmittel)

100 µg der L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukte (Herstellung siehe Beispiel 7) wurden in der Neutronenstrahlaktivierungsanlage des Kernreaktors BERII in aqua dest. bestrahlt, bis eine spezifische Aktivität von 300 - 500 MBq /100 µg bezogen auf den L-Selectin-Anteil erreicht wurde.

20

Beispiel 11: In-vivo-szintigraphische Messung nach Gabe von ¹²³I-Newport Green-L-Selectin-Kontrastmittel bzw. ¹⁹⁸Au-Kolloid-Protein G-L-Selectin-Ig-Chimären-Kontrastmittel

Die Kaninchen wurden mit Ketamin / Xylazin narkotisiert. Die Konstrukte gemäß Beispiel 10 mit einer spezifischen Aktivität von 300 - 500 MBq /100 µg bezogen auf den L-Selectin-Anteil wurden intravenös injiziert. Mittels dynamischer Messung im Minutentakt und abschließend mit einer statischen Messung nach 30 Minuten wurden die Tiere mit der Gammakamera SP4HR (Elscint, jetzt General Electronics) untersucht. Dabei wurden vor allem die Lymphknoten untersucht. Die Tiere wurden unter der Kamera positioniert, und die erste Untersuchung erfolgte vor der Gabe des Kontrastmittels. Im Anschluß an die Injektion wurde das Tier zu verschiedenen o.g. Zeitpunkten untersucht. Dabei wurde für die Bildgebung mit ¹²³Iod-Isotopen ein APC

3-Kollimator und für die Darstellung der ^{198}Au -Isotope ein APC 6-Kollimator verwendet. Lage, Größe und Erscheinungsbild der einzelnen Lymphknoten wurden bestimmt.

5 **Beispiel 12: In-vivo-Röntgenbildgebung nach Gabe von L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Goldkolloid-Kontrastmittel**

Die Tiere (Mäuse) wurden mit 0.05 ml Ketamin/Rompun (2:1) i. p. narkotisiert.

Jeweils 25 μg der L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Goldkolloide (hergestellt nach Beispiel 7) bzw. Protein G-Goldkolloide (als Negativkontrolle) wurden intravenös

10 injiziert. Nach 30 Minuten wurden die Tiere mit einem 7fach zoomfähigen Mammographen (Picker) untersucht und die zervikalen und poplitealen Lymphknoten bei 25 kV und 10 mAs Bestrahlung dargestellt. Die Darstellung der Kontrastmittelanreicherung in den Lymphknoten erfolgte bei 45 kV und 4,5 mAs Bestrahlung.

15

Beispiel 13: Synthese von partikulären Chelator-Magnetiten und Kopplung von multi-His-L-Selectin als Magnetresonanz-Kontrastmittel

Kopplung von NTA (Nitrilotriessigsäure-Derivat; α -N-[Bis-Carboxymethyl-]Lysin) an

20 **Dextranmagnetite**

Die Dextranmagnetite (US 4,101,435) wurden in wässriger Lösung mit einem 31fachen Teilchenüberschuß an Natriumperiodat (bezogen auf das Carboxydextran der Dextranmagnetithülle) für 30 min unter Rühren im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) oxidiert. Anschließend wurde das Natriumperiodat quantitativ über eine Gelfiltration

25 abgetrennt. Die Dextranmagnetite wurden in Phosphatpuffer (0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0) eluiert. Anschließend wurde NTA zu den oxidierten Dextranmagnetiten hinzugegeben und für 2 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Dabei konnte NTA im Überschuß an die Dextranmagnetite gekoppelt werden. Anschließend wurde 1/10 Volumen des Reduktionsmittels Dimethylboran

30 (150 mM in H_2O) hinzugegeben und für weitere 2 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt, gefolgt von einer Inkubation bei 4°C über Nacht. Die Abtrennung des ungebundenen NTA vom an die

Oberfläche der Dextranmagnetite gebundenen NTA erfolgte über Gel- oder Ultrafiltration. Die Dextranmagnetite wurden in PBS oder in 0.1 M HEPES (jeweils pH 7.0-7.4) eluiert und durch die Zugabe von 5 mg/ml Carboxydextran (Endkonzentration) stabilisiert. Die Partikel wurden sterilfiltriert, und es wurde

- 5 Natriumazid in einer Endkonzentration von 0.1 % hinzugegeben. Anschließend wurde der Eisengehalt der Suspension sowie die mittlere Teilchengröße der Partikel bestimmt.

- Um die Kopplungseffizienz des NTA an die Partikeloberfläche zu überprüfen, wurden die Dextranmagnetite zunächst mit 10 mM EDTA in PBS oder 0.1 M HEPES für 1 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das EDTA über
- 10 Gel- oder Ultrafiltration abgetrennt, und die Probe mit Co^{2+} , Ni^{2+} oder vergleichbaren zweiwertigen Ionen inkubiert, die von dem Chelator komplexiert werden.

- Überschüssige Ionen wurden dann über Gel- oder Ultrafiltration von den Partikeln abgetrennt. Die Anzahl an auf der Partikeloberfläche gebundenen NTA-Molekülen
- 15 konnte durch eine ICP-Messung der gebundenen Ionen bei Subtraktion der Ionen, die an unmodifizierte Dextranmagnetite binden, ermittelt werden.

Kopplung von multi-His-L-Selectin an NTA-Dextranmagnetite

- Die NTA-tragenden Dextranmagnetite wurden zunächst mit Ni^{2+} -Ionen (o. ä. Ionen) und dann mit multi-His-getaggt Selectinmolekülen in PBS oder 0.1 M HEPES mit
- 20 0.2% Milch (zur Reduktion unspezifischer Bindungen) für 10 min bei RT inkubiert. Ungebundene Selectinmoleküle wurden über geeignete Ultrafiltrationseinheiten oder über Magnetsäulen (Miltenyi Biotec) bei angelegtem Magnetfeld) abgetrennt.
- Die resultierenden Kontrastmittel-Konstrukte wurden *in vitro* auf ihre Bindungsfähigkeit z.B. im Gefrierschnitt peripherer Maus-Lymphknoten überprüft und
- 25 konnten dann für In-vivo-Experimente zur Bildgebung eingesetzt werden.

Beispiel 14: Synthese von Protein G-Magnetiten und Kopplung von L-Selectin-Ig-Chimären

Kopplung von Protein G an Dextranmagnetite

- 30 Die Dextranmagnetite wurden zunächst wie im obigen Beispiel beschrieben, mit Natriumperiodat oxidiert. Überschüssiges Natriumperiodat wurde über Gelfiltration

abgetrennt, die Dextranmagnetite wurden in Natriumazetatpuffer (100 mM Natriumazetatpuffer pH 3.9) eluiert.

Anschließend wurde Protein G hinzugeben und für 2 h bei RT im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Reduktion mit Dimethylboran erfolgte wie im obigen Beispiel beschrieben. Vor der Inkubation, die über Nacht stattfindet, wurde
5 zusätzlich zur Stabilisierung der Partikel 5 mg/ml Carboxydextran (Endkonzentration) hinzugegeben. Die Abtrennung des ungebundenen Protein G erfolgte über Ultrafiltration. Die Partikel wurden sterilfiltriert, und es wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von 0.1% hinzugegeben. Anschließend wurde der Eisengehalt der
10 Suspension sowie die Teilchengröße der Partikel bestimmt. Die Kopplungseffizienz konnte ermittelt werden, indem der Versuch in Anwesenheit kleinerer Mengen an radioaktiv markiertem Protein G durchgeführt wurde.

Kopplung von L-Selectin-Ig-Chimären

Anschließend wurden die Protein G tragenden Dextranmagnetite mit den IgG-
15 Selectinchimären für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die resultierenden Kontrastmittel-Konstrukte wurden *in vitro* auf ihre Bindungsfähigkeit z. B. im Gefrierschnitt peripherer Maus-Lymphknoten überprüft und konnten dann für In-vivo-Experimente zur Bildgebung eingesetzt werden. Bei ausreichend magnetischen Partikeln konnten zuvor die ungebundenen IgG-Selectinchimären über Magnetsäulen
20 (Miltenyi Biotec) bei angelegtem Magnetfeld abgetrennt werden.

Beispiel 15: Synthese von Dendrimer-Chelator-Signaleinheiten und Kopplung von multi-His-L-Selectin

Verwendet wurden Metallchelator-tragende Dendrimere DSM-64-NTA-Gd-DTPA
25 (Herstellung siehe WO 99/32154), die als Signaleinheit für MR-Bildgebung bis zu 28 Gadolinium-DTPA-Komplexe enthielten. 10 µg der Dendrimere, mit einer Bindungskapazität von bis zu 30 multi-His-Proteinen pro Dendrimer wurden durch Inkubation mit 50 mM Nickelacetat mit Ni²⁺-Ionen für 10 Minuten bei Raumtemperatur beladen und über PD10-Gelchromatographie von ungebundenen Ni²⁺-
30 Ionen gereinigt. Anschließend wurde der Ansatz mit 7 mg multi-His-getaggten Selectinmolekülen in 10 mM HEPES (pH 7.4) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Ungebundene Selectinmoleküle wurden über Gelchromatographie von den multi-His-

-18-

L-Selectin-Dendrimeren abgetrennt. Der Beladungsgrad betrug durchschnittlich 10-15 multi-His-L-Selectine pro Dendrimer.

- Die Bindungsfähigkeit dieser Kontrastmittel-Konstrukte wurde in vitro im Gefrierschnitt an peripheren Maus-Lymphknoten überprüft, indem die Komplexe nach
- 5 Inkubation auf dem Gefrierschnitt mit dem nichtblockierenden Antikörper LAM1-14 (Mihelcic et al., 1994) und anschließender Färbung mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper detektiert wurden.

Beispiel 16: MR-Messung von Ex-vivo-Agar-Phantomen

- 10 Die L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Magnetit-Konstrukte (hergestellt nach Beispiel 14) wurden Tieren (Mäusen, Ratten, Kaninchen) intravenös injiziert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten (z.B. 5 Minuten, 0,5 Stunden, 1 Stunde) wurden die Tiere getötet (durch Injektion einer Überdosis Narkosemittels), und verschiedene Organe (Lymphknoten, Milz, Leber) wurden entnommen und gewogen.
- 15 Beispiel In-vivo-Gabe: 4 Tiere (NMRI, Schering SPF, 18 - 22 g, weibl.)
Narkose: 0.05 ml Ketamin/Rompun (2:1) i. p.
Maus 1 u. 2: Kontrolltiere
Maus 3: erhielt ca. 443 ($\sim 24.2 \mu\text{g}$) μl DDM128N-Protein G i. v. (V. caudalis) als Kontrolle.
- 20 Maus 4: erhielt ca. 525 ($\sim 24.3 \mu\text{g}$) μl DDM128N-Protein G-Maus-L-Selectin-Ig-Chimären i. v. (V. caudalis)
Nach 5 Minuten wurden die peripheren Lymphknoten (inguinal, iliacal, zervikal, popliteal, axial), ein Stück der Leber und der Milz entnommen und gewogen.
Vorbereitung des Agar-Phantoms: Anfertigung eines Agar-Phantoms: 2 % Agar-
- 25 Lösung (für Mikrobiologie) mit 0.05 mM Magnevist®. Agar wurde in der Mikrowelle erhitzt (Einstellungen: quick digest: power 70 - 80 %, fan speed 100, time 10 min; pressure 10) bis die Lösung klar war und die Luftblasen verschwunden waren. Die erste Schicht (ca. 1-2 cm) wurde in ein rechteckiges Plastikgefäß eingefüllt, Abkühlung für ca. 30 - 60 min bei Zimmertemperatur. Die Organe wurden auf dem
- 30 Agar angeordnet und mit einer 2. Schicht flüssigem Agar überschichtet. Die Abkühlung erfolgte bis zur Aushärtung, danach wurde das Phantom im Kühlschrank gelagert.

MR-Messung: Das Phantom wurde mit verschiedenen Sequenzen gemessen. Zur Positionsbestimmung wurde eine T1-gewichtete Sequenz benutzt (z. B. TR 400 / TE 15, Rare Factor = 2, Averages = 4, Matrix 256 x 256, Schichtdicke 3 mm). Anschließend wurde das Phantom mittels Eisen (Magnetit)-sensitiver Sequenzen vermessen (T2-gewichtet: TR/TE 2500/14, Rare Factor = 16, Averages = 4, Schichtdicke 3 mm, Matrix 256 x 256; Gradienten-Echo: TR/TE 400/15, Averages = 4, Flipwinkel 30°). Für die Auswertung mit einem Bildverarbeitungsprogramm wurden ROI's (regions of interest) auf die einzelnen Organe gelegt, die Signalintensitäten bestimmt und verglichen.

10

Beispiel 17: In-vivo-MR-Messung nach Gabe von L-Selectin-Magnetit-Konstrukten

Die Tiere (Mäusen, Ratten, Kaninchen) wurden narkotisiert (z. B. Ketamin / Xylazin) und die Konstrukte nach Beispiel 14 wurden intravenös injiziert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten (z.B. 5 Minuten, 1 Stunde, 4 Stunden) wurden die Tiere mit der Magnet-Resonanz-Tomographie untersucht. Dabei wurden vor allem die Lymphknoten und entzündete Areale untersucht. Die Tiere wurden im MR-Gerät positioniert und die erste Untersuchung erfolgte vor der Gabe des Kontrastmittels. Im Anschluß an die Injektion wurde das Tier zu verschiedenen o.g. Zeitpunkten mit verschiedenen Sequenzen untersucht. Zur Positionsbestimmung wurde eine T1-gewichtete Sequenz benutzt (z. B. TR 400 / TE 15, Rare Factor = 2, Averages = 4, Matrix 256 x 256, Schichtdicke 3 mm). Anschließend wurden die Tiere mittels Eisen-sensitiver Sequenzen dargestellt (z. B. T2-gewichtet: TR/TE 2500/14, Rare Factor = 16, Averages = 4, Schichtdicke 3 mm, Matrix 256 x 256; Gradienten-Echo: TR/TE 400/15, Averages = 4, Flipwinkel 30°). Für die Auswertung mit einem Bildverarbeitungsprogramm wurden ROI's (regions of interest) auf die einzelnen Organe gelegt, die Signalintensitäten bestimmt und verglichen. Lage, Größe und Erscheinungsbild der einzelnen Lymphknoten wurden bestimmt.

Beispiel 18: Direkte und indirekte Kopplung von NIR-Farbstoffen an L-Selectin-Ig-Chimären

1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure wird in Anlehnung an bekannte Literaturverfahren durch Umsetzung mit 3-Aminopropyl-t-butylcarbammat.

- 5 Freisetzung der Aminogruppe durch saure Spaltung mit Trifluoressigsäure. in Aminopropyl]-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid übergeführt. Dieser, im folgenden als NIR-Farbstoff bezeichnet, wurde direkt mit den Maus- und Ratten-L-Selectin-Ig-Chimären kovalent gekoppelt. Die Kopplung erfolgt über eine Aminogruppe des Farbstoffes an die oxidierte Chimäre. Dabei erfolgte die
- 10 Oxidation mittels Natriumperiodat mit einem 31fachen Molekülüberschuß bezogen auf die Stoffmenge der Chimäre (100 µg) für 30 min unter Rühren im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurde das Natriumperiodat quantitativ über eine Gelfiltration abgetrennt und die Farbstoffinkubation mit 50fachem Überschuß an NIR-Farbstoff angeschlossen. Anschließend wurde 1/10 Volumen des Reduktionsmittels
- 15 Dimethylboran (150 mM in H₂O) hinzugegeben und für weitere 2 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff und Reduktionsmittel wurde durch Ultrafiltration in Phosphatpuffer (0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0) abgetrennt. Die L-Selectin-Ig-Chimären konnten mit je 2-5 NIR-Farbstoffmolekülen beladen werden, deren Fluoreszenzquantenausbeute bei etwa 50%
- 20 des Ausgangswertes lag. Die Bindungsfähigkeit der NIR-L-Selectin-Ig-Chimären wurde in vitro im Gefrierschnitt an peripheren Maus-Lymphknoten überprüft, indem die Lokalisation der NIR-fluoreszierenden Komplexe nach Inkubation direkt mittels NIR-CCD-Mikroskopkamera gezeigt wurde.

- Bei der indirekten Markierung wurde 15 µg Protein G mittels Natriumperiodat mit
- 25 einem 30fachen Molekülüberschuß bezogen auf die Stoffmenge an Protein G - wie für die direkte Markierung beschrieben - oxidiert, zwischengereinigt und mit 50fachem Überschuß an NIR-Farbstoff Li196 inkubiert. Reduktion mit Dimethylboran und anschließende Reinigung erfolgten wie oben beschrieben. Anschließend wurden in einem Volumen von 100 µl in 10 mM HEPES (pH 7.4) 10 µg der NIR-Protein G-
- 30 Konjugate mit äquimolaren Stoffmengen an Maus- bzw. Ratten-L-Selectin-Ig-Chimären (60 µg) über Nacht bei 4°C versetzt. Eine Abtrennung der einzelnen Ausgangskomponenten vom sich gebildeten L-Selectin-Ig-Chimären-NIR-Protein G-

Komplex war nicht erforderlich, da sich dieser zu 90% gebildet hatte, und die verbliebenen 10% der L-Selectin-Ig-Chimären die Bindung der Komplexe in vitro im Gefrierschnitt an periphere Maus-Lymphknoten kompetitiv nicht behinderten.

- 5 **Beispiel 19: In-vivo-NIR-Messung nach Gabe von L-Selectin-NIR-Konstrukten**
Die Tiere (Mäuse, Kaninchen) wurden narkotisiert (z. B. Ketamin / Xylazin), und die Konstrukte wurden intravenös injiziert. NMRI-Mäusen wurde je Tier 12 µg direkt markierte NIR-Maus-L-Selectinchimären (siehe Beispiel 18) intravenös injiziert. Eine Stunde nach der Injektion konnten die peripheren zervikalen und poplitealen
- 10 Lymphknoten unter NIR-Fluoreszenz mit einer NIR-CCD-Kamera (RTE/CCD-576, Visitron Systems GmbH) direkt dargestellt werden.

Beispiel 20: Funktionalisierte gasgefüllte Mikrokapseln

- 15 (a) Herstellung der Mikrokapselsuspension

In einem 20 l Reaktor werden 7 l einer wäßrigen 1%igen Octoxynol-Lösung bei einem pH-Wert von 2.5 vorgelegt und mit einem Rotor-Stator-Mischer bei hohem Schergefälle gemischt, so dass eine Selbstbegasung mit starker Schaumbildung erfolgt. 100 g

20 Cyanacrylsäurebutylester werden rasch (<1 Minute) zugegeben und dispergiert. Es wird 60 Minuten unter Selbst-begasung polymerisiert, wobei sich gasgefüllte Mikrokapseln ausbilden. In einem Scheidetrichter wird das Flotat separiert, der Unterstand abgelassen und das Flotat mit 3 l einer wäßrigen 0,02%igen Octoxynol-Lösung resuspendiert. Die so erhaltene Mikrokapselsuspension hat einen Polymergehalt von 9.46 mg/ml, eine Dichte

25 von 0.943 g/ml und einen pH-Wert von 3.5.

(b) Funktionalisierung der gasgefüllten Mikrokapseln durch partielle Seitenkettenhydrolyse

- 30 2500 g einer Mikrokapselsuspension gemäß (a) werden unter Rühren mit 50 l g Natronlauge der Konzentration $8 \cdot 10^{-2}$ mol/l versetzt. Es resultiert im Reaktionsansatz ein pH-Wert von 12.1. Es wird 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf pH 3.5 eingestellt.

Beispiel 21: Bindung von L-Selektin an funktionalisierte gasgefüllte Mikrokapseln

- Die Mikrokapselsuspension gemäß Beispiel 20 wird durch mindestens 5malige Flotation gereinigt. 1 ml der gereinigten Mikrokapselsuspension mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^9$ Partikeln pro ml werden in 10 mM Acetat, pH 4.0 umgepuffert und mit 0.1 M EDC/NHS aktiviert. Anschließend wird mit 0.25 mg Protein G (5facher Überschuß) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch eine 15minütige Inkubation mit 1M Ethanolamin abgeschlossen.
- Die gasgefüllten Mikrokapseln, an denen Protein G gebunden wurde, werden durch mehrfaches Waschen mittels Zentrifugation bei max. 500 g gereinigt. Die gereinigten, gasgefüllten Protein G-bindenden Mikrokapseln werden über Nacht mit 100 µg L-Selektin-Ig-Chimären inkubiert.
- 50 % der L-Selektinmenge wurde an den Mikrokapseln gebunden (FACS-Messung: Sättigungsreihe mit anti-Selektin-Antikörpern).

Beispiel 22: In-vivo-sonographische Messung nach Gabe von L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Polymermikrokapseln

- Die Kaninchen wurden mit Ketamin / Xylazin narkotisiert. 1 ml der echogenen L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Polymermikrokapseln (L-Selectin-Polymermikrokapseln, siehe Beispiel 21) mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^9$ Partikel/ml in isotoner wässriger Dispersion wurden intravenös injiziert. Als Kontrolle wurden Protein G-Polymermikrokapseln ohne L-Selectin-Ig-Chimären-Beladung injiziert. Direkt nach Gabe des Kontrastmittels wurde mit der sonographischen Bildgebung der cervicalen und poplitealen Lymphknoten im Harmonic Imaging Modus begonnen. Aufgrund der hepatischen Clearance ungebundener Polymermikrokapseln erreichte nach 30 Minuten das Signal-Hintergrundsverhältnis der sich im Target anreichernden L-Selectin-Polymermikrokapseln optimale Werte.

Literatur

- Baumhater, S., Singer, M. S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S. D., and Lasky, L. A. (1993). Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34.
5 Science 262, 436-8.
- Berg, E. L., McEvoy, L. M., Berlin, C., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1993). L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. Nature 366, 695-8.
- 10 Bowen, B. R., Fennie, C., and Lasky, L. A. (1990). The Mel 14 antibody binds to the lectin domain of the murine peripheral lymph node homing receptor. J Cell Biol 110, 147-53.
- Finger, E. B., Puri, K. D., Alon, R., Lawrence, M. B., von Andrian, U. H., Springer, T. A. (1996). Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. Nature
15 379, 266-269.
- Girard, J. P., and Springer, T. A. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. Immunol Today 16, 449-57.
20
- Hemmerich, S., Butcher, E. C., and Rosen, S. D. (1994). Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody. J Exp Med 180, 2219-26.
- 25 Imai, Y., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1993). Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. Nature 361, 555-7.
- Kishimoto, T. K., Jutila, M. A., and Butcher, E. C. (1990). Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule.
30 Proc Natl Acad Sci U S A 87, 2244-8.

-24-

- Maly, P., Thall, A., Petryniak, B., Rogers, C. E., Smith, P. L., Marks, R. M., Kelly, R. J., Gersten, K. M., Cheng, G., Saunders, T. L., Camper, S. A., Camphausen, R. T., Sullivan, F. X., Isogai, Y., Hindsgaul, O., von Andrian, U. H., and Lowe, J. B. (1996). The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86, 643-53.
- Mebius, R. E., and Watson, S. R. (1993). L- and E-selectin can recognize the same naturally occurring ligands on high endothelial venules. *J Immunol* 151, 3252-60.
- Mihelcic, D., Schleiffenbaum, B., Tedder, T. F., Sharar, S. R., Harlan, J. M., and Winn, R. K. (1994). Inhibition of leukocyte L-selectin function with a monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *Blood* 84, 2322-8.
- Moore, K. L., Stults, N. L., Diaz, S., Smith, D. F., Cummings, R. D., Varki, A., and McEver, R. P. (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 118, 445-56.
- Sackstein, R., Fu, L., and Allen, K. L. (1997). A hematopoietic cell L-selectin ligand exhibits sulfate-independent binding activity. *Blood* 89, 2773-81.
- Tamatani, T., Kuida, K., Watanabe, T., Koike, S., and Miyasaka, M. (1993). Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. III. Characterization of the LECAM-1 (L-selectin)-dependent adhesion pathway in rats. *J Immunol* 150, 1735-45.
- Tomschy, A., Fauser, C., Landwehr, R., and Engei, J. (1996). Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *Embo J* 15, 3507-14.

-25-

Watson, S. R., Imai, Y., Fennie, C., Geoffroy, J. S., Rosen, S. D., and Lasky, L. A. (1990). A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules. *J Cell Biol* 110, 2221-9.

- 5 Zakrzewicz, A., Gräfe, M., Terbeek, D., Bongrazio, M., Auch-Schwelk, W., Walzog, B., Graf, K., Fleck, E., Ley, K., and Gaehtgens, P. (1997). L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood* 89, 3228-35.

Patentansprüche

1. Kontrastmittel zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen
5 Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß ein Rezeptor, ein Rezeptorfragment oder eine Gruppe von Rezeptoren für spezifisch exprimierte endotheliale Liganden in definierter Ausrichtung an eine Signaleinheit gekoppelt sind.
2. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die definierte
10 Ausrichtung des Rezeptors dadurch zustande kommt, daß das C-terminale Ende des Rezeptors an die Signaleinheit gekoppelt wird, während das die Bindungsdomäne enthaltende N-terminale Ende des Rezeptors von der Signaleinheit weg gerichtet ist.
3. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor aus
15 mindestens 2 Molekülen besteht.
4. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens 2 Moleküle einen Abstand am N-terminalen Ende von 1-8 nm zeigen, oder aber einen Abstand aufweisen, der dem Abstand der N-terminalen Enden von chimären
20 Molekülen entsprechen, also z.B. Rezeptoren die gegen die Fab-Fragmente von Immunglobulinderivaten substituiert wurden.
5. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein L-Selectin-Derivat ist.
6. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor L-Selectin ist.
- 25 7. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor eine L-Selectin-Ig-Chimäre ist.
8. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein paramagnetisches Teilchen enthält.
9. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit
30 ein superparamagnetisches Teilchen enthält.
10. Kontrastmittel gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein superparamagnetisches Eisenoxidteilchen ist.

11. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein mit Gas gefülltes Teilchen ist.
12. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein paramagnetisches Metallatom enthält.
- 5 13. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein Schwermetallion enthält.
14. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein iodhaltiges Molekül enthält.
15. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit
10 ein Radionuklid enthält.
16. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein Farbstoffmolekül enthält, welches Nahinfrarotstrahlung absorbiert.
17. Kontrastmittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor mit Hilfe einer Kopplungsgruppe an die Signaleinheit gekoppelt ist.
- 15 18. Kontrastmittel gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppe ein Polyhistidinrest ist.
19. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von
20 endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß ein multimerisierter Rezeptor, welcher an die endothelialen Liganden bindet, an eine Signaleinheit gekoppelt wird.
20. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der multimerisierte Rezeptor eine L-Selectin-Ig-Chimäre ist.
- 25 21. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Rezeptoren, welche an die endothelialen Liganden
30 binden, definiert und gerichtet mit Hilfe einer Kopplungsgruppe an eine Signaleinheit gekoppelt werden.

22. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppe ein Polyhistidinrest ist.
23. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der C-Terminus eines L-Selectin-Moleküls an ein Streptavidin-, Avidin- oder Biotinmolekül gekoppelt ist, die Signaleinheit ein Biotin-, Streptavidin- oder Avidinmolekül enthält, und die Kopplung durch die spezifische Bindung zwischen Streptavidin und Biotin bzw. Avidin und Biotin beim Zusammengeben der L-Selectin-Moleküle mit der Signaleinheit entsteht.
24. Verwendung von L-Selectin-Ig-Chimären zur Herstellung von Kontrastmitteln für die Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind.